

UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Zakład Patomorfologii Lekarskiej

Kierownik: prof. dr hab. Lech Chykowski

15-269 Białystok ul. Waszyngtona 13, tel.: (0..85) 748 5945, fax: (0..85) 748 5990, e-mail:

patlek@umb.edu.pl

Białystok, 03.05.2015

Opinia
o dysertacji doktorskiej pt.
Ekspresja receptora melatoninowego MT1 w komórkach raka jajnika

autorstwa Agaty Zemła

Praca wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Piotra Dzięgiela
kierownika Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Zasadniczym przedmiotem badań Doktorantki była ocena ekspresji receptorów melatoninowych MT1 w liniach raka jajnika i liniach prawidłowego nabłonka płciowego tego narządu. Ponadto Doktorantka postanowiła zbadać ewentualne działanie synergistyczne melatoniny w skojarzonym stosowaniu z cisplatyną na komórki raka jajnika w warunkach *in vitro*.

Temat dysertacji doktorskiej jest wyjątkowo aktualny z co najmniej kilku powodów. Rak jajnika, chociaż zajmuje dopiero szóste miejsce wśród nowotworów występujących u kobiet, cechuje się wyjątkowo złym rokowaniem. Wskaźnik 5-letnich przeżyć u chorych na ten nowotwór wynosi w Europie 30% do 33%, zaś. Wg danych WHO, Polska zajmuje tu jedno z ostatnich jedno z ostatnich miejsc. Dotychczasowa terapia chorych na raka jajnika, oparta na stosowaniu pochodnych platyny, w dalszym ciągu jest mało skuteczna, obarczona licznymi skutkami ubocznymi. Pojawiają się doniesienia o możliwości zwiększenia jej skuteczności i zminimalizowania skutków ubocznych przy stosowaniu leczenia skojarzonego z naturalnie występującymi związkami, w tym także melatoniny.

Przedmiot badań, jakie podjęła Doktorantka uważam więc za ciekawy i uzasadniony - zarówno z uwagi na aspekty poznawcze, jak i codzienną praktykę lekarza ginekologa i onkologa. Nabiera szczególnego znaczenia w świetle dotychczasowych badań wykonanych przez prof. Dzięgiela i Jego zespół nad rolą melatoniny i receptorów melatoninowych w

nowotworach. Dodam, iż Doktorantka legitymuje się dorobkiem naukowym w postaci trzech publikacji (dwie oryginalne, jedna pogładowa), dotyczących tematyki podjętej w pracy doktorskiej, co tym bardziej uwiarygodnia wykonane przez nią badania.

Monografia przedstawiona mi do oceny liczy 101 stron druku komputerowego. Posiada układ typowy dla doktorskich dysertacji.

Wstęp poprzedzony jest spisem treści i wykazem skrótów. We *Wstępie* Autorka zwraca uwagę na niekorzystne dane epidemiologiczne dotyczące występowania raka jajnika, a także na ułomność dotychczas stosowanych sposobów terapii chorych na ten nowotwór. W zwięzły sposób omawia znaczenie melatoniny w hamowaniu procesu kancerogenezy poprzez działanie antyoksydacyjne i hamujące fazy S i M cyklu komórkowego. Dość szczegółowo omawia budowę i funkcję receptorów błonowych melatoniny, szczególnie receptora MT1. Uważam, że *Wstęp*, napisany zwięźle, logicznie i bardzo przystępnie. Jest dobrym wprowadzeniem do podjętej tematyki badań i logicznym uzasadnieniem projektu. Opatrzony jest w kilkoma schematami, które znacznie ułatwiają czytelnikowi zrozumienie podstaw molekularnych znaczenia melatoniny i jej receptorów w procesie kancerogenezy.

Jako **cel pracy** Autorka postawiła sobie następujące zadania: 1. Detekcja ekspresji receptora melatoniny (MT1) w komórkach linii nabłonka powierzchniowego jajnika oraz w komórkach hodowlanych linii raka tego narządu w celu potwierdzenia jego obecności w ww. komórkach. 2. Badania potencjalnego synergistycznego działania melatoniny w skojarzonym stosowaniu z cis platyną na komórki linii raka jajnika. 3. Próba określenia roli MT1 w mechanizmie skojarzonego stosowania ww. substancji. *Cel pracy* podany jest w sposób jasny. Wyływa z rozważań zawartych we wstępie.

Jak wynika z rozdziału **Material i metody**, doświadczenia przeprowadzono na trzech liniach komórkowych: linii prawidłowego nabłonka powierzchniowego jajnika (IOSE 364) i dwóch liniach raka jajnika cechujących się średnią (linia SK-OV-3) i wysoką (OVCAR-3) agresywnością. W badaniach posłużono się nowoczesnymi metodami opartymi na powszechnie przyjętych technikach genetyczno-molekularnych i proteomicznych. Do badań ekspresji genu MT1 stosowano technikę Real-time PCR, lokalizację białek badano metodą immunofluorescencyjną, poziom ekspresji białka badano techniką Western Blot. Żywotność komórek oceniono testem kolorymetrycznym SRB. W celu zablokowania receptorów

melatoniny zastosowano luzindol. Dawki melatoniny i cisplatyny dobrano na podstawie własnych, uprzednio wykonanych licznych eksperymentów oraz danych literaturowych. Do oceny interakcji między melatoniną i cisplatyną posłużono się współczynnikiem interakcji leków (CDI).

Dobór materiału badawczego i metody badań zastosowane przez Doktorantkę są metodami całkowicie akceptowalnymi i dobrze dobranymi do postawionych zadań badawczych. Zastosowane schematy postępowania laboratoryjnego nie budzą żadnych zastrzeżeń. Autorka dokładnie opisała wszystkie zastosowane laboratoryjne procedury, co pozwala na ich odtworzenie. Wyniki badań opracowano statystycznie dobrze dobranymi metodami.

Wyniki badań Autorka opisała na 20 stronach. Uzyskane dane Autorka przedstawiła w postaci dwudziestu tabel (załączonych na końcu pracy i zilustrowała je dziewiętnastoma wykresami, uzupełnionymi opisami tekstowymi. Autorka wykazała, że komórki prawidłowego nabłonka pokrywającego jajnik, jak również komórki dwóch badanych linii raka jajnika posiadają receptor melatoniny MT1. Najwyższy poziom ekspresji tego receptora Autorka wykazała w prawidłowym nabłonku pokrywającym jajnik. Najniższy w komórkach raka o wysokiej agresywności (linia OVCAR-3). Melatonina w stosowanych dawkach obniżała przeżywalność hodowanych komórek. Melatonina w wybranych stężeniach wykazywała synergizm w działaniu z cisplatyną, bądź też jej działanie było addytywne – w zależności od zastosowanej kombinacji dawek obu substancji. Autorka wykazała także, iż działanie melatoniny nie odbywa się poprzez receptor MT1. Wyniki badań uważam za ciekawe. Nie tylko potwierdzają i porządkują dotychczasowe dane opublikowane na ten temat w literaturze, ale wnoszą także nowe informacje.

Dyskusja, to dość istotny rozdział każdej pracy doktorskiej. Autorka skupia się tu przede wszystkim na własnych spostrzeżeniach wynikających z przeprowadzonych badań i konfrontuje je z danymi uzyskanymi przez innych autorów. Potrafi swobodnie poruszać się wśród licznych, nierzadko kontrowersyjnych i sprzecznych, literaturowych doniesień dotyczących p/nowotworowego działania melatoniny. Ze swadą dojrzałego naukowca dokonuje porównań wyników badań dotyczących działania melatoniny na komórki innych nowotworów w eksperymentach wykonanych zarówno w swoim, jak i w innych ośrodkach badawczych.

Zwraca uwagę na konieczność dalszych badań i dociekań nad biologicznymi możliwościami tego, w dalszym ciągu, nie do końca poznanego i tajemniczego hormonu. Praca wykonana przez Doktorantkę stawia nowe pytania i wyzwania, przez co udowadnia, iż nauka nigdy nie jest w pełni zakończona. Pokazuje, iż żmudna praca laboratoryjna, chociaż nie zawsze przynosi spektakularne sukcesy, jest fascynująca.

Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań Doktorantka zawarła w 4 punktach. Autorka w pierwszym wniosku wyraża opinię, iż obniżona ekspresja receptora MT1 w komórkach badanych linii raka jajnika może przemawiać za udziałem tego receptora w kancerogenezie. Jest to wniosek wyrażony z dużą ostrożnością (Autorka użyła tu sformułowania ...”może świadczyć”...). Zachowanie ostrożności jest tu ze wszelkich miar słuszne. Udowodnienie prawdziwości tej tezy wymaga bowiem odrębnych badań. W drugim wniosku Doktorantka ustosunkowuje się do zaobserwowanego w badaniach własnych braku korelacji pomiędzy ekspresją genu a ekspresją białka MT1. Uważa, iż może to być wynikiem złożonej regulacji ekspresji badanego receptora. Teza ta otwiera drogę do dalszych badań i dociekań. We wniosku trzecim Autorka wyraża opinię, że cytostatyczne działanie melatoniny w badanym przez siebie układzie nie odbywa się poprzez receptory. W rozważaniach zawartych we wstępie ocenianej monografii znajdujemy teoretyczne wytłomaczenie tego fenomenu. Wniosek czwarty wyraża nadzieję o możliwości klinicznych aplikacji obserwowanej synergii i addycji p/nowotworowego działania melatoniny i cis platyny. Uważam, iż wnioski sformułowane są poprawnie pod względem logicznym, a także w swej zasadniczej części oparte są o wyniki badań własnych.

Praca zaopatrzona jest w wyczerpujące **streszczenie** w języku polskim i angielskim.

Piśmiennictwo liczy 97 pozycji. W zdecydowanej większości pochodzi z ostatnich 15 lat (jedynie 6 pozycji datuje się na lata 90-te poprzedniego wieku). Jest to dodatkowy argument przemawiający za aktualnością podjętych przez doktorantkę badań, o czym już wspomniałem na początku swojej opinii. O wiarygodności wykonanych badań świadczy fakt, że aż 8 pozycji cytowanych w ocenianej pracy jest wynikiem prac zespołu, z którego pochodzi Doktorantka. Praca doktorska wpisuje się więc dobrze w dotychczasowy dorobek i osiągnięcia zespołu badawczego kierowanego przez prof. Piotra Dzięgiela.

Podsumowanie dysertacji, którą recenzowałem, jest wysoce pozytywne. Temat pracy, niezwykle aktualny i pożyteczny z punktu widzenia praktyki lekarskiej, jest bardzo dobrze wybrany. Jego realizację przeprowadzono w sposób wzorowy. Doktorantka wykazała się dużą wiedzą, którą oparła o aktualne piśmiennictwo, wykorzystane we wstępie, metodyce i dyskusji. Wykazała, że potrafi swobodnie korzystać z nowoczesnych technik laboratoryjnych. Potrafiła, bazując na uzyskanych wynikach badań, wyciągnąć właściwe wnioski, które otwierają wrota do dalszych dociekań i badań.

Wniosek końcowy:

Rozprawa doktorska pt.: ***Ekspresja receptora melatoninowego MT1 w komórkach raka jajnika*** autorstwa Agaty Zemła, wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Piotra Dzięgiela - kierownika Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.)

W związku z powyższym składam na ręce Pani dziekan Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Agaty Zemła do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie proponuję wyróżnienie pracy, o ile macierzysta uczelnia dysponuje takimi możliwościami.



Prof. dr hab. Lech Chyczewski